

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from <i>Geotrichum candidum</i> NBRC 5767
著者(和文)	曹晨
Author(English)	Chen Cao
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9593号, 授与年月日:2014年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松田 知子,中村 聡,三原 久和,和地 正明,福居 俊昭
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9593号, Conferred date:2014/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻:	生物プロセス	専攻	申請学位(専攻分野):	博士	(工学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名:	CHEN CAO		指導教員(主):	松田 知子	
Student's Name			Academic Advisor(main)		
			指導教員(副):		
			Academic Advisor(sub)		

要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

光学活性化合物は医薬農薬中間体等として不可欠であるので、持続的社會を構築するためには、効率的かつ高立体選択的な触媒を利用する環境にやさしい不斉合成反応の開発は急務である。特に、フッ素官能基は特有の性質を有しているため、光学活性含フッ素化合物の合成は重要である。有機合成の触媒としては、化学触媒および酵素(生体触媒)が挙げられるが、それらは相補的な役割を果たす。本研究では、有機合成の触媒として有用な酵素の開発を行う。酵素の中でも、酸化還元酵素は、プロキラルなケトンの不斉還元反応により光学活性アルコールを得るために有用な触媒である。加水分解酵素は幅広く有機合成に用いられている一方、酸化還元酵素を用いる有機合成反応の開発は遅れている。そこで、新たに見いだされた *G. candidum* NBRC 5767 のフルオロケトン還元酵素 (FLRD) は光学活性含フッ素化合物の合成に有用であるため、本論文では、本酵素を単離精製し性質を解明することを目的とする。

最初に、*G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD の単離精製を行った。これまでに報告例がない FLRD の精製に、硫酸沈殿および 6 ステップのクロマトグラフィーにより成功した。ゲル濾過クロマトグラフィーと SDS-PAGE の結果より、本酵素は二量体として存在していることを明らかにした。また、酵素を触媒として光学活性化合物の合成を行う際には酵素反応の立体選択性が非常に重要であるが、精製酵素によるトリフルオロアセトフェノンの不斉還元反応の立体選択性は非常に高く、生成物の鏡像体過剰率 (e. e.) は 99% 以上であった。

次に、*G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD の性質を解明した。本酵素によるトリフルオロアセトフェノンの還元反応の反応条件 (pH、温度、金属イオン、添加物) の検討結果、pH 8.0 および 60℃ で相対活性が最大となり、pH 6.5 ~ 7.5 および 50 ~ 80℃ ではその 80% 以上の活性を示した。また、1.0 mM の CaCl₂ を添加することにより相対活性は 265% 向上した。トリフルオロアセトフェノンを基質とする速度論的解析から、 V_{max} は 4.78 $\mu\text{mol}/\text{min per milligram of protein}$ であり K_m は 0.75 mM であった。

還元反応の基質特異性の検討結果より、アリアルメチルケトン等のケトンの不斉還元反応において、 α 位のフッ素官能基により活性が大きく影響を受けることを見いだした。例えば、アセトフェノン、2-アセチルチオフェン、および 3-アセチルチオフェンの α 位の水素がフッ素で置換された、モノフルオロメチルケトン、ジフルオロメチルケトン、およびトリフルオロメチルケトンの還元反応を行うと、 α 位のフッ素の数が相対反応速度に大きな影響を与えた。アセトフェノン、2-アセチルチオフェン、および 3-アセチルチオフェンのいずれの場合にも、ジフルオロメチルケトンの相対反応速度が一番大きくなった。それに対して、 α 位がフッ素置換されていないアセトフェノンなどのメチルケトンの還元反応では相対活性が極端に低くなり、また、アリアル基上の水素がフッ素に置換された *o*-フルオロアセトフェノン、*m*-フルオロアセトフェノン、*p*-フルオロアセトフェノンやペンタフルオロアセトフェノン等のケトンの還元反応には、フッ素の効果は得られなかった。

これらの α 位のフッ素置換による活性向上の機構を以下に示す。フッ素は一番電気陰性度が高く水素の次に小さい原子であるためにフッ素官能基は独特の性質を有している。本酵素にはフッ素官能基とのアフィニティーが非常に高い“フッ素官能基結合部位”が存在すると推測される。フッ素官能基結合部位とは、負電荷を持つフッ素官能基表面と相互作用するために、正電化を帯びているアミノ酸が並んでいる部位と予測できる。

最後に、*G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD の cDNA の増幅に成功し、アミノ酸配列の一部を推定した。*G. candidum* NBRC 5767 の mRNA から cDNA を合成し、また、単離精製した FLRD のリシルエンドペプチダーゼ消化断片の 3 か所の内部アミノ酸配列をもとにプライマーの設計を行い、PCR により遺伝子を増幅し塩基配列を決定し 312 残基のアミノ酸配列を明らかにした。

以上をまとめると、本論文では、*G. candidum* NBRC 5767 から酵素を単離精製に成功し、性質の解明を行い、本酵素はケトンの α 位のフッ素置換を認識できることを見いだした。さらに、一部のアミノ酸配列を明らかにした。今後、本研究は、本酵素の大量発現および工業的な利用に結びつくことと期待できる。

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生物プロセス	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (工学) Doctor of
学生氏名 : Student's Name	CHEN CAO		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	松田 知子
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Among chiral compounds, enantiomerically pure alcohols are particularly useful as building blocks for the synthesis of natural products, pharmaceuticals, and agricultural chemicals. Especially, fluorinated chiral alcohols have received increased attention in recent years due to their physicochemical properties concerning biological activity, stability, and lipophilicity. So that dehydrogenases/reductases are among the most requested enzymes for the preparation of optically active compounds, for the inherent advantages in terms of their high chemo-, regio-, and enantioselectivity.

Previously, a strain of *Geotrichum candidum* NBRC 4597 that can reduce aromatic and aliphatic ketones was studied. Further study suggested that there are two classes of enzymes in *G. candidum* NBRC 4597: fluorinated and non-fluorinated ketone reductases. Acetophenone and trifluoroacetophenone were reduced to opposite configurations. A similar strain, *G. candidum* NBRC 5767, also has two kinds of reductases, and because of the unique properties of the fluorinated ketone reductase (FLRD), I have deep interest in FLRD. In this study, I conducted the purification, characterization and partial gene cloning of a novel fluorinated ketone reductase from *G. candidum* NBRC 5767 and found that it specifically recognizes the ketones containing fluorines at the α position.

The purification process of FLRD was determined, and through ammonium sulfate fractionation and several chromatographies, this enzyme was purified successfully to 510 fold with 2.8% yield. Gel filtration chromatography with SDS-PAGE revealed this protein to be a dimer of 60 kDa subunits.

The effect of pH, temperature, and metal ion as well as the substrate specificity, and other characteristics were investigated. This enzyme is highly selective toward α fluorinated ketones, making it valuable for understanding the interaction between the fluorinated groups and the proteins. I assume that this reductase has a fluorine recognition pocket. Such properties suggest a promising future in industrial application for the synthesis of chiral fluorinated compounds.

The purified FLRD was digested by lysyl-endopeptidase, and partial internal amino acid sequences were determined. Based on the internal amino acid sequences, primers were designed to amplify the partial gene of FLRD by PCR. 936bp DNA sequence (corresponding to 312 amino acids) of FLRD was determined.